

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the U.S. Postal Service with sufficient postage as First Class Mail, in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, Washington, DC 20231, on the date shown below.

Dated: March 28, 2002

Signature

(Michael H. Teschner)

Docket No.: EGY 3.0-018  
(PATENT)

1743#6

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:  
Nouadje et al.

Application No.: 10/052,931

Group Art Unit: 1743

Filed: January 18, 2002

Examiner: Not Yet Assigned

For: CAPILLARY ELECTROPHORESIS SYSTEMS  
AND ADDITIVES

COPY OF PAPERS  
ORIGINALLY FILED

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

RECEIVED  
APR 16 2002  
TC 1700

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

Country	Application No.	Date
France	01/00762	January 19, 2001

In support of this claim, a certified copy of the original foreign application is filed herewith.

Dated: March 28, 2002

Respectfully submitted,

By

Michael H. Teschner

Registration No.: 32,862

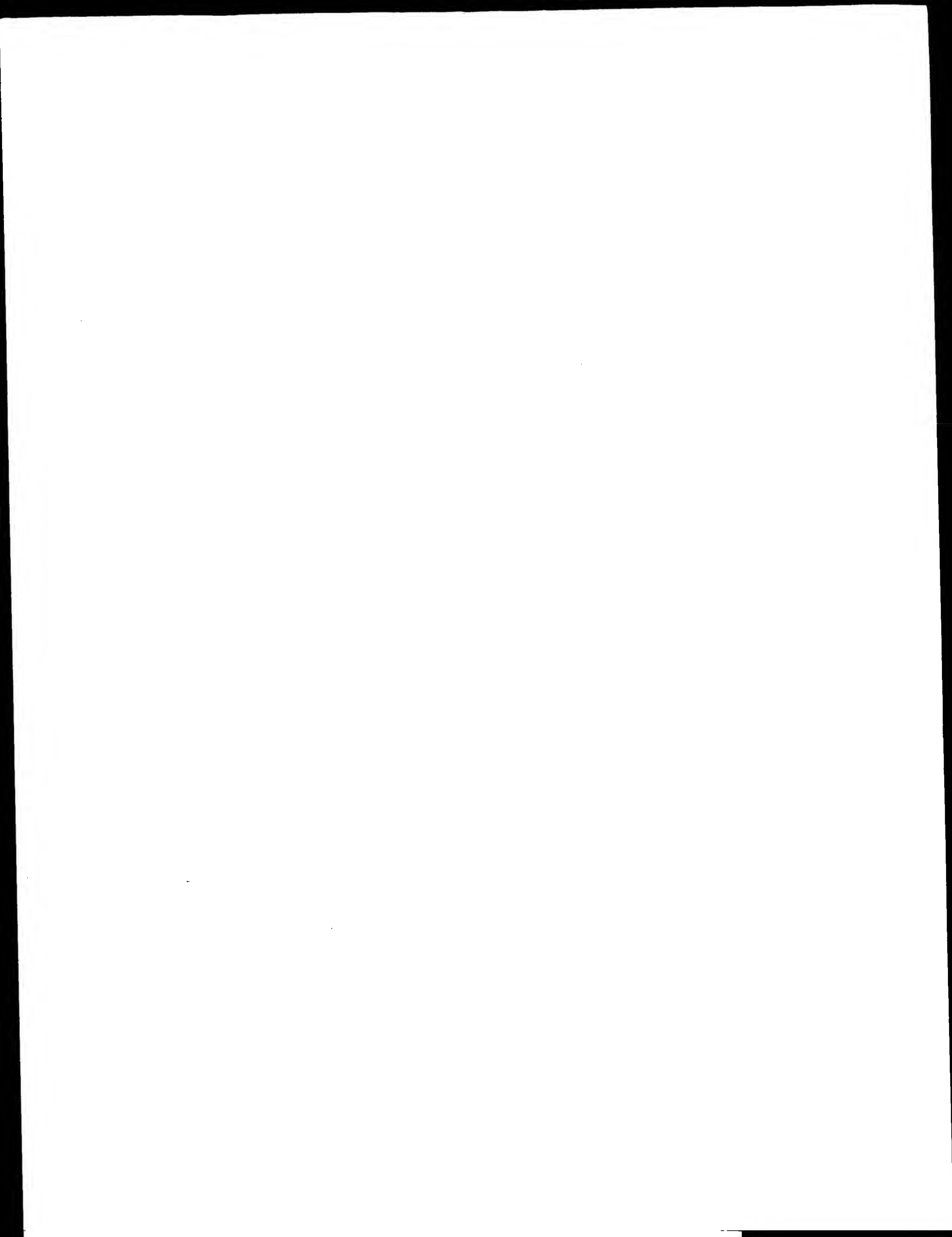
LERNER, DAVID, LITTENBERG,  
KRUMHOLZ & MENTLIK, LLP

600 South Avenue West

Westfield, New Jersey 07090

(908) 654-5000

Attorneys for Applicant



09 2226 2 -  
EX 12.1 12.1  
①

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 Mars 2002

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30  
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <u>19-01-01</u> LIEU <u>75</u> N° D'ENREGISTREMENT <u>0100762</u> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <u>19 JAN. 2001</u> PAR L'INPI		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A. 3 rue Chauveau-Lagarde 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) B4721-JV			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date <u>    </u> / <u>    </u> / <u>    </u>
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	N°
			Date <u>    </u> / <u>    </u> / <u>    </u>
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE SEPARATION DE PROTEINES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE ET COMPOSITIONS DE TAMPON POUR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date <u>    </u> / <u>    </u> / <u>    </u> N° Pays ou organisation Date <u>    </u> / <u>    </u> / <u>    </u> N° Pays ou organisation Date <u>    </u> / <u>    </u> / <u>    </u> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		SEBIA	
Prénoms			
Forme juridique		société anonyme	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	23 rue Maximilien Robespierre	
	Code postal et ville	92130	ISSY LES MOULINEAUX
Pays		France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 19.01.01 LIEU 75 N° D'ENREGISTREMENT 0100762 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		B4721-JV	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom		VAILLANT	
Prénom		Jeanne	
Cabinet ou Société		ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A.	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	3 rue Chauveau-Lagarde	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 44 51 18 00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 42 66 08 90	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		info@egyp.fr	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) VAILLANT Jeanne CPI n° 97.0801		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

La présente invention concerne un procédé pour la séparation de protéines et peptides par électrophorèse capillaire ainsi que des compositions de tampon comportant un additif utile pour cette séparation.

Il est connu d'analyser le taux des protéines dans des liquides biologiques comme du sérum, avec des visées analytiques et notamment diagnostiques, et usuellement de séparer des protéines par électrophorèse, tant en électrophorèse sur gel qu'en électrophorèse capillaire. L'un des intérêts de l'électrophorèse capillaire réside dans le fait que de très petites quantités des liquides biologiques à analyser sont nécessaires. De plus la séparation par cette technique peut être très rapide, dans la mesure où de forts voltages peuvent être utilisés sans que l'échantillon ne s'échauffe trop lors de la séparation.

Pour la séparation des protéines sériques, on effectue classiquement l'électrophorèse capillaire avec des tampons alcalins. Usuellement, les profils protéiques obtenus comportent cinq ou six fractions que sont la fraction albumine, les fractions  $\alpha_1$ - et  $\alpha_2$ -globuline, la fraction  $\beta$ -globuline ou les fractions  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -globuline et la fraction  $\gamma$ -globuline.

De telles séparations peuvent être faites, en électrophorèse capillaire, notamment, à l'aide de tampons d'analyse et techniques tels que décrits aux brevets US Re 36 011 ou EP 518 475.

Jusqu'ici, en électrophorèse capillaire notamment, la séparation de l'albumine et de l' $\alpha_1$ -globuline est toutefois insatisfaisante.

La demanderesse a maintenant mis en évidence qu'en utilisant un additif au tampon d'analyse, additif comportant un pôle anionique à un pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe, il était possible d'obtenir une séparation améliorée, notamment la séparation albumine/ $\alpha_1$ -globuline. Ces additifs sont capables d'une part d'interactions hydrophobes avec un ou plusieurs constituants protéiques et d'autre part capables d'apporter à ce



ou ces constituants protéiques une ou plusieurs charges négatives et d'en modifier la mobilité électrophorétique.

Ainsi l'invention concerne un procédé d'électrophorèse capillaire en solution libre à pH alcalin pour l'analyse d'échantillons comportant des constituants protéiques, dans lequel on introduit l'échantillon dans un tube capillaire contenant un tampon d'analyse, ledit tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif capable d'interaction hydrophobe avec un ou plusieurs constituants protéiques et capable d'apporter à ce ou ces constituants protéiques une ou plusieurs charges négatives et d'en modifier la mobilité électrophorétique. Cette étape est en général suivie de la séparation des constituants protéiques par migration et détection des constituants.

L'invention concerne également un procédé de séparation par électrophorèse des constituants protéiques d'échantillons comportant de l'albumine et les fractions  $\alpha_1$ - ;  $\alpha_2$ - ;  $\beta$ - (ou  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -) ; et  $\gamma$ -globuline, dans un tampon d'analyse, dans lequel le tampon d'analyse comporte un additif en outre au moins capable d'interaction hydrophobe avec l'albumine.

La présente invention concerne également un procédé de séparation électrophorétique, par électrophorèse capillaire à pH alcalin en solution libre, des constituants protéiques d'un échantillon liquide, procédé dans lequel on fait passer l'échantillon comportant lesdits constituants dans un capillaire contenant un tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif, l'additif étant un composé comportant un pôle anionique à un pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe.

Ainsi, les composés utiles comme additif pour tampon d'analyse en électrophorèse capillaire de l'invention sont notamment capables d'interaction hydrophobe avec l'albumine ; ces composés peuvent être par exemple des surfactants anioniques tels que ceux utilisés en MECC (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography), mais à une concentration inférieure à leur concentration micellaire critique. Dans la présente invention, nous utilisons ces composés en EC en solution libre : il



y a apport de charges négatives sur l'albumine par interaction hydrophobe entre les résidus hydrophobes de l'albumine et la partie hydrophobe de ces composés, d'où une diminution de la mobilité de l'albumine par rapport à celle des autres protéines. Une des conséquences est la séparation améliorée de l'albumine et de la fraction  $\alpha_1$ .

Enfin, l'invention concerne des compositions d'électrolyte pour l'électrophorèse capillaire comportant au moins un tampon et un additif capable d'interaction hydrophobe avec l'albumine, dans un support acceptable.

Comme cela apparaît dans les exemples, l'utilisation d'additifs selon l'invention permet une séparation améliorée des fractions albumine et  $\alpha_1$ -globuline. Elle permet en outre un meilleur retour à la ligne de base entre ces deux fractions qu'avec les tampons usuels.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée, des exemples et figures annexées.

La figure 1 représente un électrophérogramme d'un sérum humain normal analysé par électrophorèse capillaire en utilisant un tampon glycine.

La figure 2 représente un électrophérogramme d'un sérum humain normal analysé par électrophorèse capillaire en utilisant le même tampon glycine avec un additif selon l'invention.

La figure 3 représente un électrophérogramme d'un sérum humain normal analysé par électrophorèse capillaire en utilisant un tampon borate.

La figure 4 représente un électrophérogramme d'un sérum humain normal analysé par électrophorèse capillaire en utilisant le même tampon borate avec un additif selon l'invention.

La figure 5 représente un électrophérogramme d'un sérum humain normal, obtenu par électrophorèse sur gel d'agarose.

La figure 6 représente un électrophérogramme d'un sérum d'un patient présentant un syndrome inflammatoire aigu, réalisé en électrophorèse capillaire avec un tampon glycine.

La figure 7 représente un électrophérogramme d'un sérum d'un patient présentant un syndrome inflammatoire aigu réalisé en électrophorèse capillaire en utilisant le même tampon glycine avec un additif selon l'invention.

La figure 8 représente un électrophérogramme d'un sérum d'un patient présentant un syndrome inflammatoire aigu réalisé en électrophorèse capillaire avec un tampon borate.

La figure 9 représente un électrophérogramme d'un sérum d'un patient présentant un syndrome inflammatoire aigu réalisé en électrophorèse capillaire en utilisant le même tampon borate avec un additif selon l'invention.

La figure 10 représente un électrophérogramme du sérum d'un patient présentant un syndrome inflammatoire aigu, obtenu par électrophorèse sur gel d'agarose.

La figure 11 illustre pour diverses longueurs de la chaîne carbonée d'un alkylsulfonate additionné à un tampon borate usuel, la mobilité de la fraction  $\alpha_1$ -globuline et celle de la fraction albumine.

A titre d'additif pour tampon utile selon l'invention et capable d'interaction avec la partie hydrophobe de l'albumine, on peut citer les composés comportant un pôle anionique à pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe. La partie hydrophobe peut être composée d'au moins une chaîne alkyle, ramifiée ou non, de 4 à 20 atomes de carbone, et/ou d'au moins une combinaison de 1 à 10 cycles, aromatiques ou non. On préfère des combinaisons de 1 à 4 cycles. Comme cela sera facilement compris du spécialiste, cette partie hydrophobe pourra comporter des résidus ou fonctions qui ne modifient pas essentiellement son caractère hydrophobe, comme un ou plusieurs groupements hydroxy ou amine, par exemple.

Le pôle anionique peut être constitué par un ou plusieurs des groupes ou fonctions chimiques de la liste suivante : sulfonates, carboxylates, sulfates, phosphates, carbonates.

On peut ainsi citer notamment les surfactants anioniques du type cholate, les C<sub>6</sub> à C<sub>10</sub>-alkylsulfonates, le tétradécènesulfonate, les naphtalènesulfonates, les C<sub>6</sub> à C<sub>14</sub> alkylcarboxylates, les naphtalènegarboxylates, les C<sub>4</sub> à C<sub>14</sub> alkylsulfates, les C<sub>4</sub> à C<sub>14</sub>-alkylcarbonates, les benzènesulfonates, les benzènegarboxylates et les tampons biologiques zwitterioniques.

Dans les dénominations ci-dessus, les radicaux alkyle sont de préférence linéaires.

Parmi les tampons biologiques zwitterioniques utilisables comme additif, on peut citer notamment les tampons CAPS (acide 3-cyclohexylamino-1-propane-sulfonique) et CHES (acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonique), mais tout autre tampon biologique zwitterionique est utilisable selon l'invention.

Parmi les additifs cités ci-dessus, on préfère les C<sub>6</sub> à C<sub>10</sub> alkylsulfonates et parmi les C<sub>6</sub> à C<sub>10</sub> alkylsulfonates, on préfère particulièrement l'octanesulfonate.

Ces composés sont connus en soi et disponibles dans le commerce. Ils peuvent être sous forme acide ou sous forme de sels.

Par échantillon selon l'invention, on entend l'échantillon biologique à analyser, préalablement dilué avec une solution de dilution appropriée ou du tampon d'analyse, par exemple, ou pur.

Comme échantillon, on peut analyser tout liquide biologique de patients sains ou malades. Ainsi, les liquides biologiques humains peuvent être du sérum normal ou pas, et aussi du sang hémolysé, du plasma, de l'urine ou du fluide cérébro-spinal. Outre les échantillons biologiques humains, on peut analyser des échantillons d'origine animale. Les échantillons peuvent aussi être des protéines synthétiques, et le procédé

de l'invention peut alors avoir des visées de contrôle de production par exemple.

Les additifs selon l'invention sont particulièrement utiles pour les analyses de sérum, et la séparation de protéines sériques, dans des échantillons humains.

Dans les échantillons de sérum, les protéines sériques à séparer sont l'albumine et les fractions  $\alpha_1$ - ;  $\alpha_2$ - ;  $\beta$  (ou  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -) ; et  $\gamma$ -globuline.

A titre de tampon d'analyse, on peut utiliser tout tampon d'analyse connu, adapté à la séparation souhaitée, et utile en électrophorèse en général, et en électrophorèse capillaire en particulier. A titre d'exemples, on peut citer les tampons borate, phosphate et carbonate, les tampons à base d'acide aminé et les tampons dits biologiques.

Comme tampon biologique, on peut citer les tampons connus sous les noms de Bis-TRIS (2-bis[2-hydroxyéthyl]amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol), ADA (acide N-[2-acétamido]-2-iminodiacétique), ACES (acide 2-[2-acétamino]-2-aminoéthanesulfonique), PIPES (acide 1,4-pipérazinediéthanesulfonique), MOPSO (acide 3-[N-morpholino]-2-hydroxypropanesulfonique), Bis-TRIS PROPANE (1,3-bis[tris(Hydroxyméthyl)méthylaminolpropane]), BES (acide N,N-bis[2hydroxyéthyl]-2-aminoéthanesulfonique), MOPS (acide 3-[N-morpholino]propanesulfonique), TES (acide 2-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthylamino]éthanesulfonique), HEPES (acide N-[2-hydroéthyl]piperazine-N'-(2-éthanesulfonique)), DIPSO (acide 3-N,N-bis[2-hydroxyéthyl]amino-2-hydroxypropanesulfonique), MOBS (acide 4-N-morpholinobutanesulfonique), TAPSO (acide 3[N-tris-hydroxyméthyl-méthylamino]-2-hydroxypropane sulfonique), TRIS (2-amino-2-[hydroxyméthyl]-1,3-propanediol), HEPPSO (acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-hydroxypropanesulfonique]), POPSO (acide piperazine-N,N'-bis[2-hydroxypropanesulfonique], TEA (triéthanolamine), EPPS (acide N-[2-hydroxyéthyl]-piperazine-N'-[3-propane-sulfonique]), TRICINE (N-tris[hydroxyméthyl]méthylglycine), GLY-GLY (diglycine),

BICINE (N,N-bis[2-hydroxyéthyl]-glycine), HEPBS (acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[4-butanesulfonique]), TAPS (acide N-tris[hydroxyméthyl]méthyl-3-aminopropanesulfonique), AMPD (2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol), TABS (acide N-tris[hydroxyméthyl]méthyl-4-amino butane sulfonique), AMPSO (acide 3-[(1,1-diméthyl-2-hydroxyéthyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonique), CHES (acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonique), CAPSO (acide 3-[cyclohexylamino]-2-hydroxy-1-propanesulfonique), AMP (2-amino-2-méthyl-1-propanol), CAPS (acide 3-cyclohexylamino-1-propane-sulfonique) ou CABS (acide 4-[cyclohexylamino]-1-butanesulfonique), de préférence AMPD, TABS, AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS ou CABS.

Du point de vue du pH du liquide biologique dans le tampon d'analyse, y compris l'additif, celui-ci peut varier entre 2 et 12. Néanmoins, en électrophorèse capillaire à pH alcalin, le pH est compris entre 8 et 12, de préférence entre 9 et 11, et de façon plus particulièrement préférée à une valeur d'environ 10.

Les tampons d'analyse selon l'invention peuvent en outre comporter au moins un composé modifiant le pH. A titre de modificateur de pH, on peut utiliser un composé choisi parmi l'hydroxyde de lithium, l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de rubidium, l'hydroxyde de césium, l'hydroxyde de francium, un hydroxyde de mono-, di-, tri- ou tétra-alkyl ammonium ayant de 1 à 8 atomes de carbone dans la partie alkyle.

Selon l'invention, les tampons d'analyse sont utilisés dans les conditions et concentrations usuelles, à savoir de l'ordre de 10 à 500 mM, de préférence 20 à 400 mM.

Les additifs selon l'invention sont utilisés dans des concentrations allant de 0,1 mM à 500 mM, sans toutefois excéder leur concentration micellaire critique dans le tampon d'analyse.

Cette valeur de concentration micellaire critique intervient pour les additifs qui sont des surfactants.



Lorsque l'octanesulfonate est utilisé, sa concentration dans le tampon est de l'ordre de 1 à 4 mM, et de préférence la concentration est d'environ 2,5 mM.

Les compositions de tampon de l'invention sont préparées de façon usuelle pour des compositions de tampon d'analyse, à savoir par adjonction des constituants sous forme liquide, ou solide à diluer, à un support acceptable. De façon usuelle, le support est de l'eau, distillée ou déminéralisée.

Du point de vue des matériaux utilisés pour les capillaires, ceux-ci sont usuels en électrophorèse capillaire. Ainsi, on peut utiliser des capillaires de silice fondue. Leur diamètre interne peut aller de 5 à 2 000  $\mu\text{m}$ . De façon préférée, on utilise selon l'invention des capillaires de diamètre interne inférieur à 200  $\mu\text{m}$ , de préférence inférieur à 100  $\mu\text{m}$ . On utilise de préférence des capillaires à surface intérieure non traitée. Le spécialiste saura adapter la nature du capillaire et sa taille aux besoins de l'analyse.

## Exemples

### MATERIEL ET METHODES

#### A) Electrophorèse capillaire (méthode A)

L'électrophorèse capillaire d'échantillons cliniques est réalisée sur un appareil d'EC équipé d'un capillaire en silice fondue de diamètre interne 25 microns. La détection est réalisée à 200 nm. Les échantillons sont placés dans le passeur d'échantillons de l'appareil et injectés automatiquement par injection hydrodynamique (50 mbars pendant 7 s). La séparation des échantillons est réalisée en moins de 10 minutes en appliquant un champ électrique d'environ 400 V/cm. Le capillaire est lavé avant chaque analyse par la soude 0,5 M, puis par le tampon d'analyse.

#### Tampons d'analyse :

Les produits chimiques utilisés sont de grade analytique.

Le tampon glycine 150 mM est préparé en dissolvant 11,26 g de glycine (masse molaire 75,07 g/mol) dans 1 l d'eau déminéralisée. La



Lorsque l'octanesulfonate est utilisé, sa concentration dans le tampon est de l'ordre de 1 à 4 mM, et de préférence la concentration est d'environ 2,5 mM.

5 Dans les procédés de l'invention, le tampon d'analyse peut en outre comporter du sulfate de sodium.

Les compositions de tampon de l'invention sont préparées de façon usuelle pour des compositions de tampon d'analyse, à savoir par adjonction des constituants sous forme liquide, ou solide à diluer, à un support acceptable. De façon usuelle, le support est de l'eau, distillée ou  
10 déminéralisée.

Du point de vue des matériaux utilisés pour les capillaires, ceux-ci sont usuels en électrophorèse capillaire. Ainsi, on peut utiliser des capillaires de silice fondue. Leur diamètre interne peut aller de 5 à 2 000  $\mu\text{m}$ . De façon préférée, on utilise selon l'invention des capillaires de  
15 diamètre interne inférieur à 200  $\mu\text{m}$ , de préférence inférieur à 100  $\mu\text{m}$ . On utilise de préférence des capillaires à surface intérieure non traitée. Le spécialiste saura adapter la nature du capillaire et sa taille aux besoins de l'analyse.

## Exemples

### 20 MATERIEL ET METHODES

#### A) Electrophorèse capillaire (méthode A)

L'électrophorèse capillaire d'échantillons cliniques est réalisée sur un appareil d'EC équipé d'un capillaire en silice fondue de diamètre interne 25 microns. La détection est réalisée à 200 nm. Les échantillons  
25 sont placés dans le passeur d'échantillons de l'appareil et injectés automatiquement par injection hydrodynamique (50 mbars pendant 7 s). La séparation des échantillons est réalisée en moins de 10 minutes en appliquant un champ électrique d'environ 400 V/cm. Le capillaire est lavé avant chaque analyse par la soude 0,5 M, puis par le tampon d'analyse.

30 Tampons d'analyse :

Les produits chimiques utilisés sont de grade analytique.

Le tampon glycine 150 mM est préparé en dissolvant 11,26 g de glycine (masse molaire 75,07 g/mol) dans 1 l d'eau déminéralisée. La

concentration finale est de 150 mM et le pH est ajusté à 10,0 par addition de pastilles de soude (masse molaire : 40,0 g/mol).

Le tampon borate 150 mM est préparé en dissolvant 9,3 g d'acide borique (masse molaire : 61,83 g/mol) dans 1 l d'eau déminéralisée, et 5,1 g de soude (masse molaire : 40,0 g/mol). La concentration finale est de 150 mM et le pH de 10,0.

#### B) Electrophorèse sur gel d'agarose (méthode B)

L'analyse comparative de protéines sériques est réalisée sur gel d'agarose. 10 µL de sérum ont été chargés dans chaque puits de l'applicateur à membrane décrit dans les brevets EP 0 493 996, US 5,464,515, US 5,405,516. L'applicateur ainsi chargé a ensuite été appliqué à la surface d'un gel d'agarose pendant 30 s. La séparation de ces échantillons appliqués sur ce gel d'agarose a été obtenue par électrophorèse pendant 7,5 minutes environ et à une puissance de 20 W, sur un instrument permettant de réguler la température à 20°C. Après migration, le gel a été séché et coloré à l'amidoschwarz. Après coloration, le gel est décoloré et séché à nouveau. Les gels sont alors analysés par densitométrie ce qui permet d'obtenir les profils protéiques.

#### C) Echantillons cliniques :

Pour l'EC, les sérums humains sont dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans le tampon d'analyse.

#### Exemple 1 (comparatif)

Un tampon d'analyse glycine est préparé comme ci-dessus. On a analysé du sérum normal.

L'électrophorèse a été réalisée selon la méthode A ci-dessus.

Comme cela apparaît sur la figure 1, l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, cinq pics successifs attribués respectivement aux fractions  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ -globuline et albumine.

### Exemple 2

Au tampon d'analyse de l'exemple 1, on ajoute de l'octanesulfonate à une concentration de 2,5 mM.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 1.

5 Comme cela apparaît sur la figure 2, l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, cinq pics successifs attribués respectivement aux fractions  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ -globuline et albumine. Par comparaison avec le résultat de l'exemple 1, la séparation entre les deux fractions  $\alpha_1$ -globuline et albumine est nettement améliorée et le retour à la

10 ligne de base est meilleur.

### Exemple 3 (comparatif)

On opère comme à l'exemple 1, le tampon d'analyse utilisé étant un tampon borate préparé comme indiqué ci-dessus.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 1.

15 Comme cela apparaît sur la figure 3 l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, six pics successifs attribués respectivement aux fractions  $\gamma$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\alpha_1$ -globuline et albumine.

### Exemple 4

20 Au tampon de l'exemple 4, on ajoute de l'octanesulfonate à une concentration de 2,5 mM.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 1.

Comme cela apparaît sur la figure 4, l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, six pics successifs attribués respectivement aux fractions  $\gamma$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ -globuline et albumine. La

25 séparation entre les deux fractions  $\alpha_1$ - et albumine est nettement améliorée et le retour à la ligne de base est meilleur.

### Exemple 5 (comparatif)

On obtient l'électrophérogramme de la figure 5 en analysant le même sérum qu'aux exemples précédents par la méthode B ci-dessus. Par

30 comparaison avec le résultat obtenu aux exemples 2 et 4, on constate que

ces modes de réalisation permettent d'obtenir une résolution pratiquement comparable à la résolution obtenue sur gel d'agorose.

#### Exemple 6 (comparatif)

Un tampon d'analyse glycine 150 mM a été préparé.

Du sérum à fortes  $\alpha_1$ - et  $\alpha_2$ -globulines a été analysé.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 1.

Comme cela apparaît sur la figure 6, l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, cinq pics successifs attribués respectivement aux fractions  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ -globuline et albumine.

#### Exemple 7

Au tampon d'analyse de l'exemple 7, on ajoute de l'octanesulfonate à une concentration de 2,5mM.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 6.

Comme cela apparaît sur la figure 7, l'électrophérogramme obtenu présente, de gauche à droite, cinq pics successifs attribués respectivement aux fractions  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ -globuline et albumine. Par comparaison avec le résultat de l'exemple 6, la séparation entre les deux fractions  $\alpha_1$ -globuline et albumine est nettement améliorée et le retour à la ligne de base est meilleur.

#### Exemple 8 (comparatif)

On opère comme à l'exemple 6, le tampon utilisé étant un tampon borate 150 mM.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 6.

Comme cela apparaît sur la figure 8 l'électrophérogramme obtenu dans les mêmes conditions présente, de gauche à droite, six pics successifs attribués respectivement aux fractions  $\gamma$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ -globuline et albumine.

#### Exemple 9

Au tampon de l'exemple 8, on ajoute de l'octanesulfonate à une concentration de 2,5 mM.

L'électrophorèse a été réalisée comme à l'exemple 6.

Comme cela apparaît sur la figure 9, l'électrophérogramme obtenu dans les mêmes conditions présente, de gauche à droite, six pics successifs attribués respectivement aux fractions  $\gamma$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ -globuline et albumine. La séparation entre les deux fractions  $\alpha_1$ - et albumine est améliorée par un meilleur retour à la ligne de base. On observe que la fraction  $\alpha_1$  est composée de deux pics, dont l'un, qui correspond à l'orosomucoïde était, en l'absence d'octanesulfonate, confondu avec le pic de l'albumine.

#### Exemple 10 (comparatif)

On obtient l'électrophérogramme de la figure 10 en analysant le même sérum qu'aux exemples 6 à 9 par la méthode B ci-dessus. Par comparaison avec le résultat obtenu aux exemples 7 et 9, on constate que ces modes de réalisation permettent d'obtenir une résolution pratiquement comparable à la résolution obtenue sur gel d'agarose.

#### Exemple 11

On a mesuré la mobilité ( $\text{mn}^{-1}$ ) comparée de l' $\alpha_1$ -globuline et de l'albumine, dans un tampon borate (150 mM) à pH 10, par la méthode A ci-dessus. On a ajouté des alkylsulfonates de longueur (n) de chaîne alkyle croissante (n représente 4, 6, 8 et 10 respectivement pour  $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_6$ ,  $\text{C}_8$  et  $\text{C}_{10}$  et  $n=0$  correspond à un tampon sans alkylsulfonate) à une concentration de 2,5 mM au tampon borate. Les mobilités des fractions alpha-1 et albumine ont été calculées et reportées sur le graphique de la figure 11. On observe une nette diminution de la mobilité de l'albumine (■) par rapport à celle de la fraction alpha-1 (◆) à partir d'une chaîne en  $\text{C}_6$ .

### REVENDICATIONS

1. Procédé d'électrophorèse capillaire en solution libre à pH alcalin pour l'analyse d'échantillons comportant des constituants protéiques, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape où :  
5 on introduit l'échantillon dans un tube capillaire contenant un tampon d'analyse, ledit tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif capable d'interaction hydrophobe avec un ou plusieurs constituants protéiques et capable d'apporter à ce ou ces constituants protéiques une  
10 ou plusieurs charges négatives et d'en modifier la mobilité électrophorétique.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte en outre la séparation des constituants par migration et la détection de ces constituants.
- 15 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'échantillon est biologique.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de sérum, du sang hémolysé, plasma, urine ou liquide céphalo-rachidien.
- 20 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les constituants sont des protéines sériques.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les constituants sont l'albumine et les fractions  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - ou  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - et  $\gamma$ -globuline.
- 25 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ledit additif comporte un pôle anionique à un pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit additif comporte une partie hydrophobe composée d'au moins  
30 une chaîne alkyle, ramifiée ou non, de 4 à 20 atomes de carbones, et/ou d'au moins une combinaison de 1 à 10 cycles, aromatiques ou non, et un



pôle anionique constitué par un ou plusieurs groupes choisi(s) parmi les sulfonates, carboxylates, sulfates, phosphates et carbonates.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit additif est choisi parmi les surfactants anioniques du type cholate, les  $C_6$  à  $C_{10}$ -alkylsulfonates, le tétradécènesulfonate, les naphthalènesulfonates, les  $C_6$  à  $C_{14}$ -alkylcarboxylates, les naphthalénecarboxylates, les  $C_4$  à  $C_{14}$ -alkylsulfates, les  $C_4$  à  $C_{14}$ -alkylcarbonates; les benzènesulfonates, les benzénecarboxylates et les tampons biologiques zwitterioniques.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'additif est un  $C_6$  à  $C_{10}$  alkylsulfonate.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'additif est l'octanesulfonate.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la concentration en additif dans le tampon est comprise entre 0,1 mM et 500 mM, sans excéder le cas échéant la concentration micellaire critique dudit additif dans ledit tampon.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la concentration dudit additif dans ledit tampon est comprise entre 1 mM et 4 mM.

14. Procédé selon l'une des revendication 1 à 13, caractérisé en ce que la concentration d'additif dans le tampon est de l'ordre de 2,5 mM.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le pH dudit tampon d'analyse est compris entre 9 et 11.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que le capillaire est en silice fondue.

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le tampon d'analyse comprend en outre au moins un modificateur de pH.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que le modificateur de pH est choisi parmi l'hydroxyde de lithium, l'hydroxyde de

sodium, l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de rubidium, l'hydroxyde de césium, l'hydroxyde de francium, un hydroxyde de mono-, di-, tri- ou tétra-alkyl ammonium ayant de 1 à 8 atomes de carbone dans la partie alkyle.

19. Procédé de séparation par électrophorèse des constituants protéiques d'échantillons comportant de l'albumine et les fractions  $\alpha_1$ - ;  $\alpha_2$ - ;  $\beta$ - ou  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ - ; et  $\gamma$ -globuline, dans un tampon, procédé dans lequel le tampon comporte en outre au moins un additif capable d'interaction hydrophobe avec l'albumine.

20. Procédé de séparation électrophorétique, par électrophorèse capillaire à pH alcalin en solution libre, des constituants protéiques d'un échantillon liquide, procédé dans lequel on fait passer l'échantillon comportant lesdits constituants dans un capillaire contenant un tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif, l'additif étant un composé comportant un pôle anionique chargé négativement à un pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe.

21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que le tampon d'analyse comporte en outre du sulfate de sodium.

22. Composition d'électrolyte pour électrophorèse capillaire, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un tampon et en outre au moins un additif capable d'interaction hydrophobe avec l'albumine dans un support acceptable.

23. Composition pour électrophorèse capillaire, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un tampon d'analyse et un additif comportant une partie hydrophobe composée d'au moins une chaîne alkyle, ramifiée ou non, de 4 à 20 atomes de carbones, et/ou d'au moins une combinaison de 1 à 10 cycles, aromatiques ou non, et un pôle anionique constitué par un ou plusieurs groupes choisi(s) parmi les sulfonates, carboxylates, sulfates, phosphates et carbonates.

24. Composition pour électrophorèse capillaire selon la revendication 23, caractérisée en ce que ledit additif est choisi parmi les surfactants anioniques du type cholate, les  $C_6$  à  $C_{10}$ -alkylsulfonates, le

sodium, l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de rubidium, l'hydroxyde de césium, l'hydroxyde de francium, un hydroxyde de mono-, di-, tri- ou tétra-alkyl ammonium ayant de 1 à 8 atomes de carbone dans la partie alkyle.

5 19. Procédé de séparation par électrophorèse des constituants protéiques d'échantillons comportant de l'albumine et les fractions  $\alpha_1$ - ;  $\alpha_2$ - ;  $\beta$ - ou  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ - ; et  $\gamma$ -globuline, dans un tampon, procédé dans lequel on fait passer l'échantillon comportant lesdits constituants dans un capillaire contenant un tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif capable d'interaction hydrophobe avec l'albumine.

10 20. Procédé de séparation électrophorétique, par électrophorèse capillaire à pH alcalin en solution libre, des constituants protéiques d'un échantillon liquide, procédé dans lequel on fait passer l'échantillon comportant lesdits constituants dans un capillaire contenant un tampon d'analyse comportant en outre au moins un additif, l'additif étant un  
15 composé comportant un pôle anionique chargé négativement à un pH supérieur à 9 et une partie hydrophobe.

21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que le tampon d'analyse comporte en outre du sulfate de sodium.

20 22. Composition d'électrolyte pour électrophorèse capillaire, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un tampon et en outre au moins un additif capable d'interaction hydrophobe avec l'albumine dans un support acceptable.

25 23. Composition pour électrophorèse capillaire, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un tampon d'analyse et un additif comportant une partie hydrophobe composée d'au moins une chaîne alkyle, ramifiée ou non, de 4 à 20 atomes de carbones, et/ou d'au moins une combinaison de 1 à 10 cycles, aromatiques ou non, et un pôle anionique constitué par un ou plusieurs groupes choisi(s) parmi les sulfonates, carboxylates, sulfates, phosphates et carbonates.

30 24. Composition pour électrophorèse capillaire selon la revendication 23, caractérisée en ce que ledit additif est choisi parmi les

tétradécènesulfonate, les naphtalènesulfonates, les  $C_6$  à  $C_{14}$ -alkylcarboxylates, les naphtalénecarboxylates, les  $C_4$  à  $C_{14}$ -alkylsulfates, les  $C_4$  à  $C_{14}$ -alkylcarbonates; les benzènesulfonates, les benzénecarboxylates et les tampons biologiques zwitterioniques.

5           25. Composition selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que l'additif est un  $C_6$  à  $C_{10}$ -alkylsulfonate.

26. Composition selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisée en ce que l'additif est l'octanesulfonate.

5 surfactants anioniques du type cholate, les  $C_6$  à  $C_{10}$ -alkylsulfonates, le tétradécènesulfonate, les naphthalènesulfonates, les  $C_6$  à  $C_{14}$ -alkylcarboxylates, les naphthalèncarboxylates, les  $C_4$  à  $C_{14}$ -alkylsulfates, les  $C_4$  à  $C_{14}$ -alkylcarbonates; les benzènesulfonates, les benzèncarboxylates et les tampons biologiques zwitterioniques.

25. Composition selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que l'additif est un  $C_6$  à  $C_{10}$ -alkylsulfonate.

26. Composition selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisée en ce que l'additif est l'octanesulfonate.

1/3

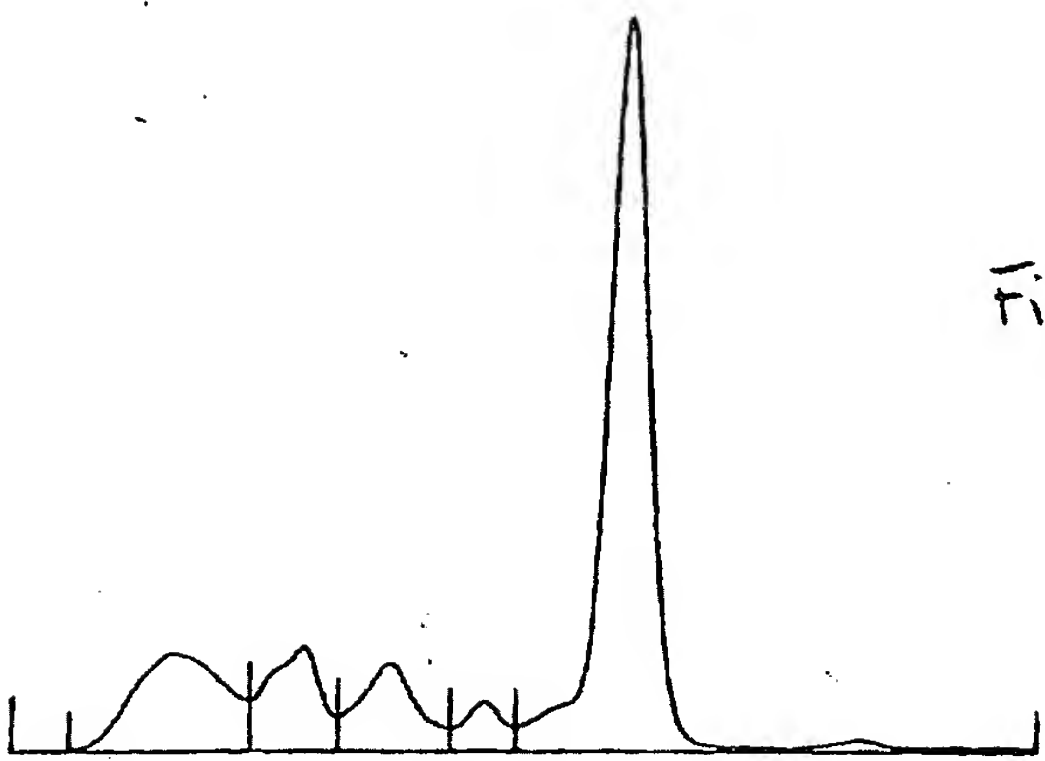


Fig 1

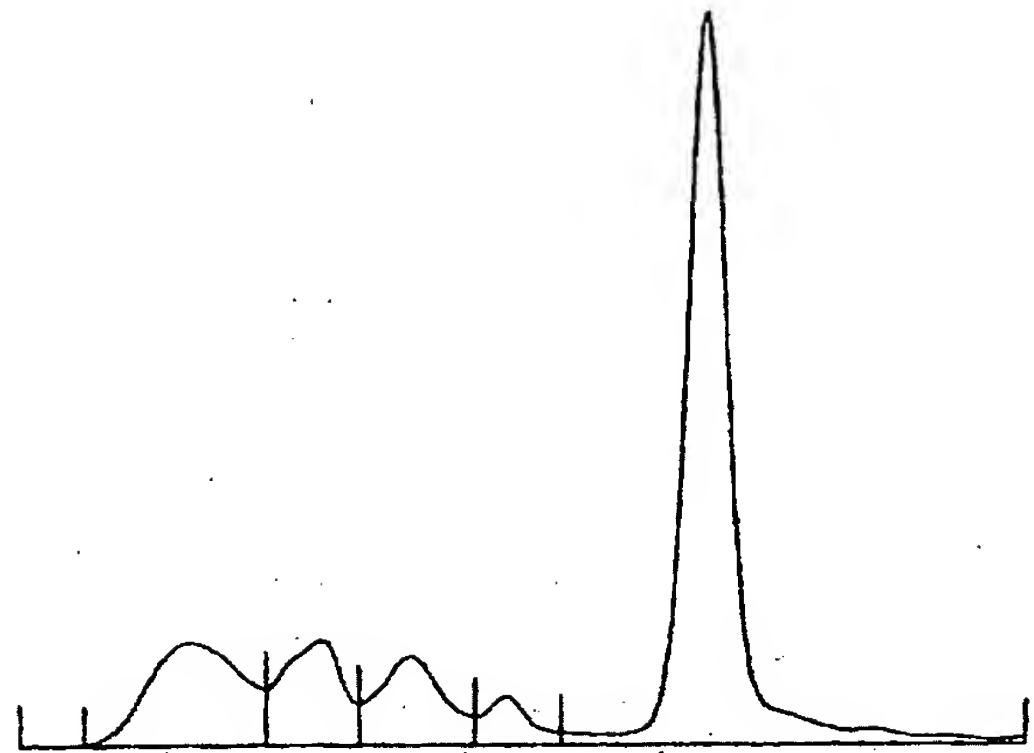


Fig 2

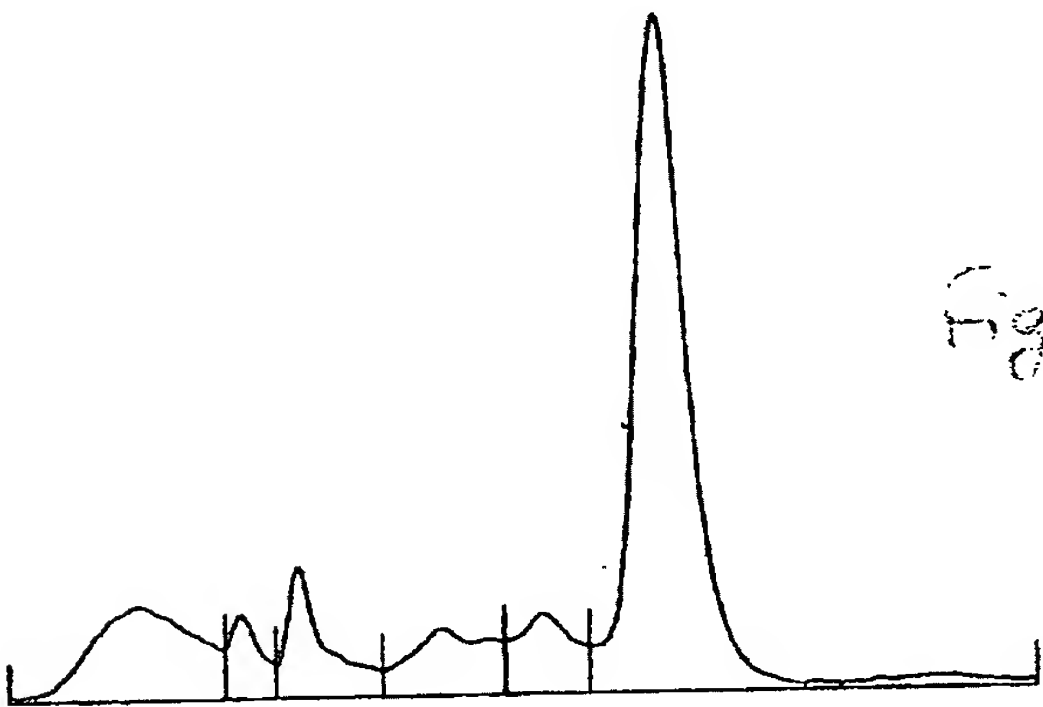


Fig 3

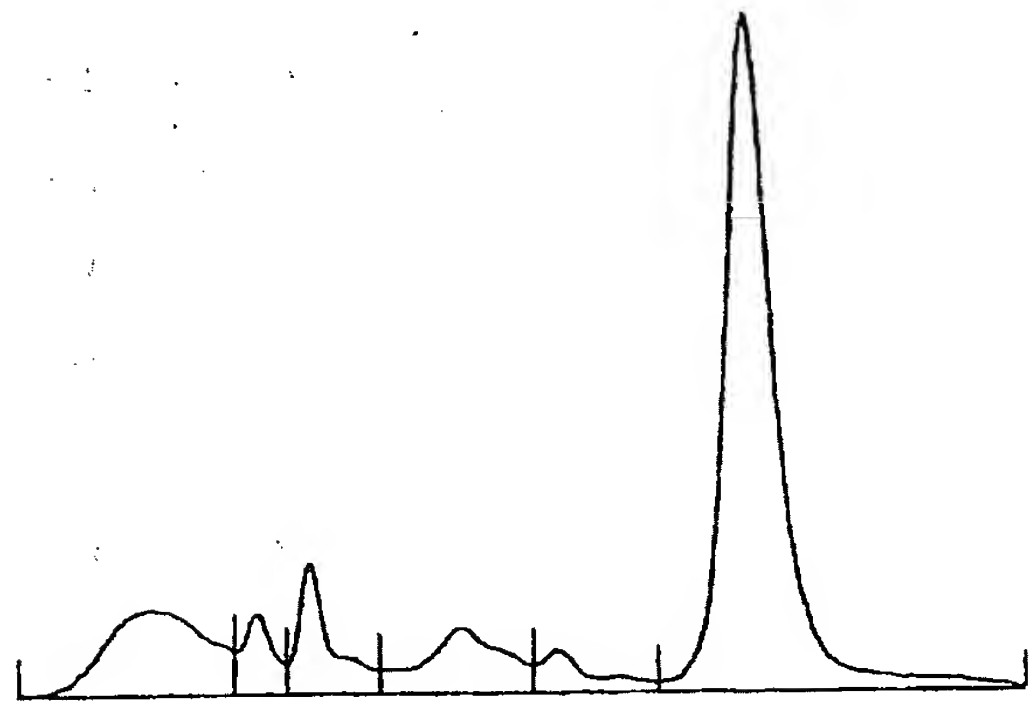


Fig 4

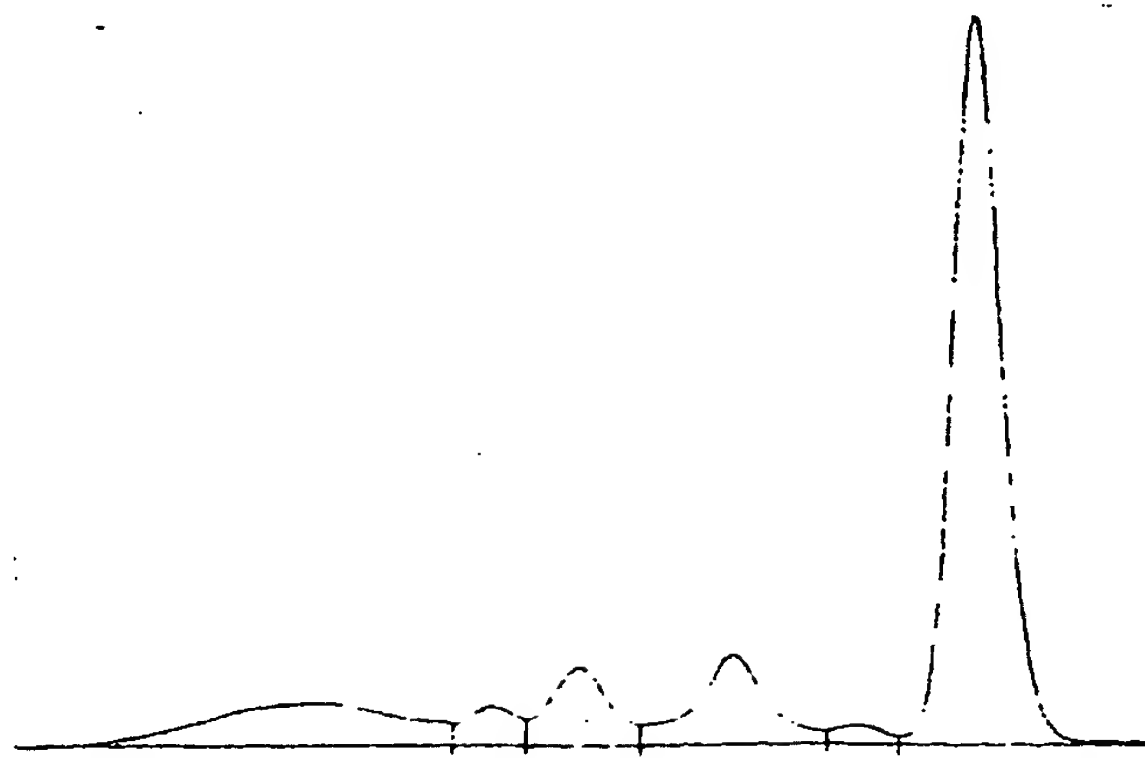
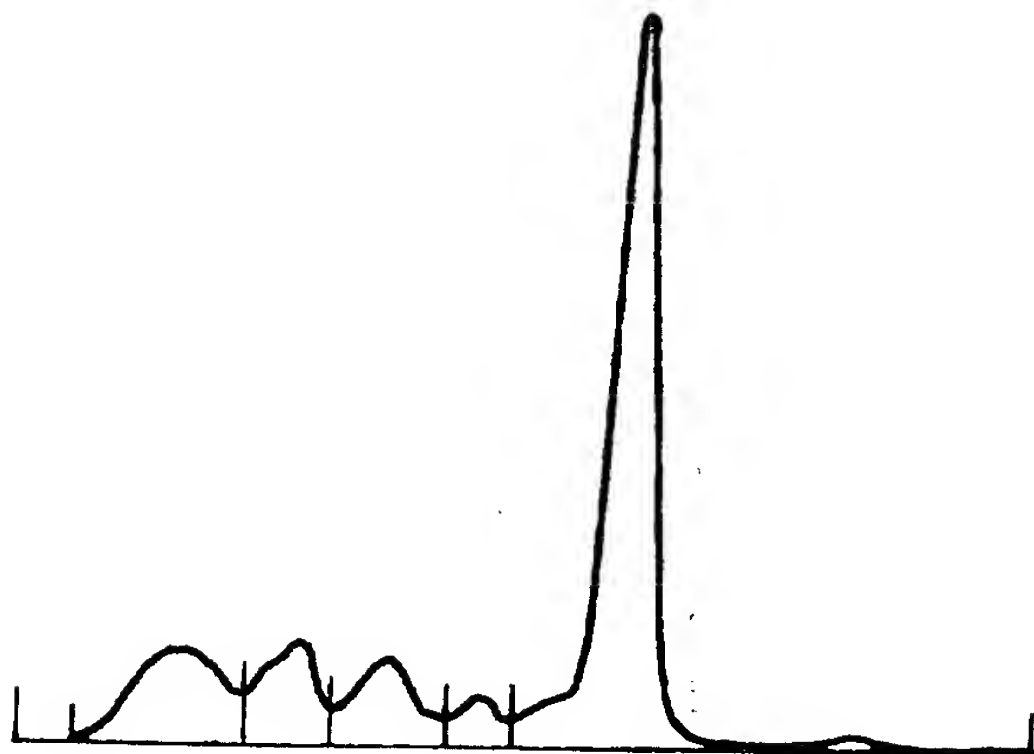


Fig 5

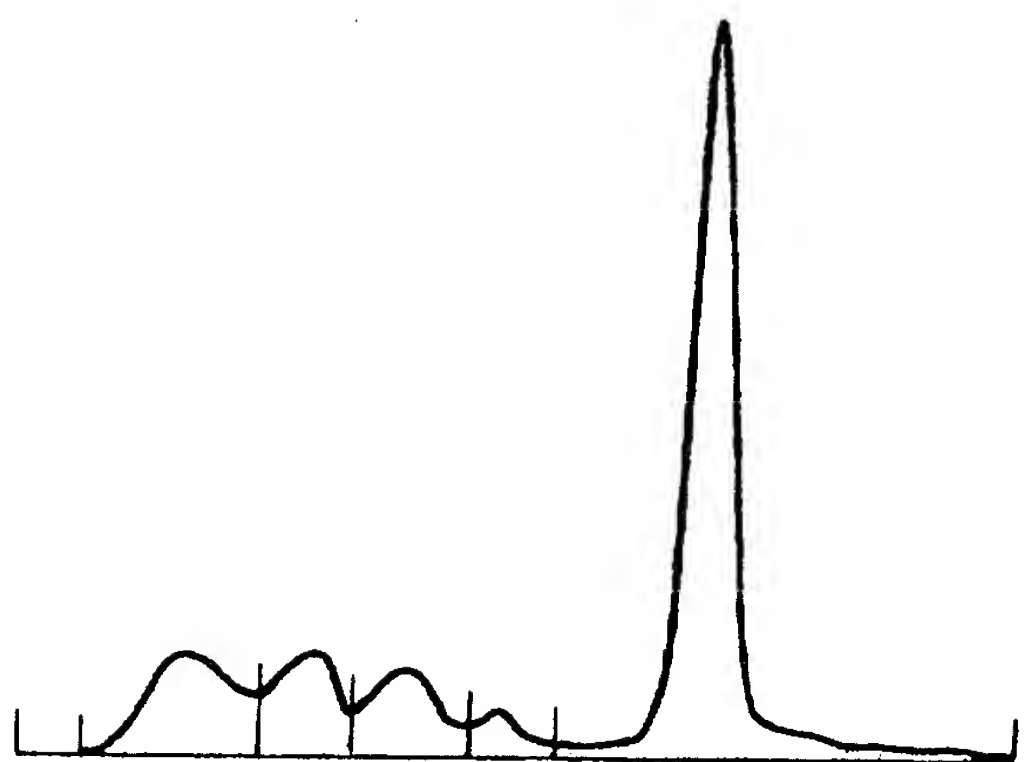


1/3

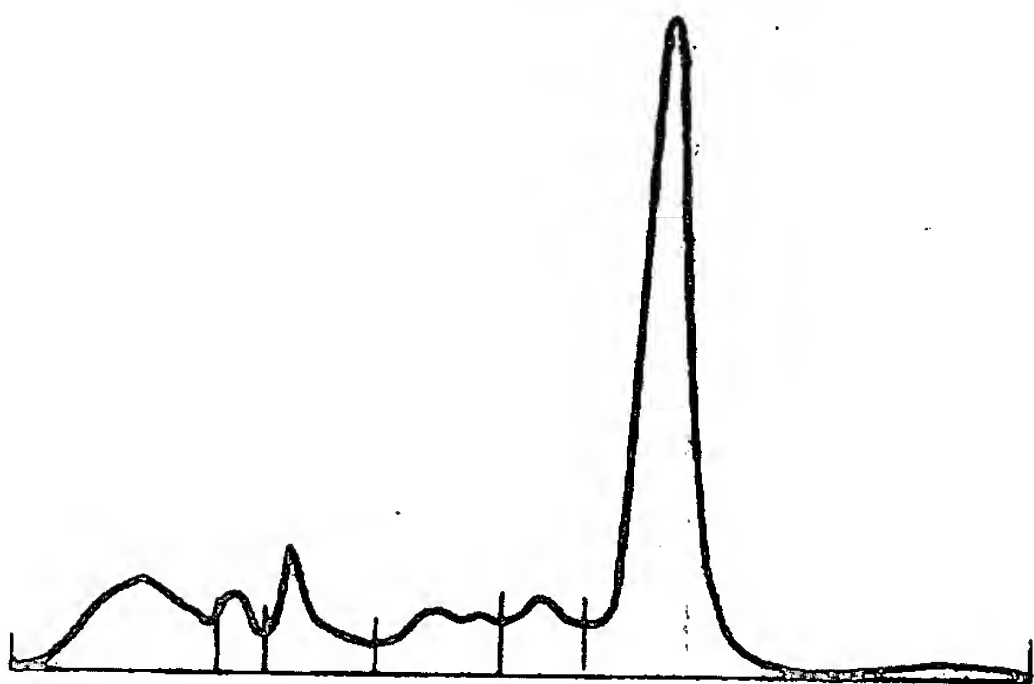
FIG\_1



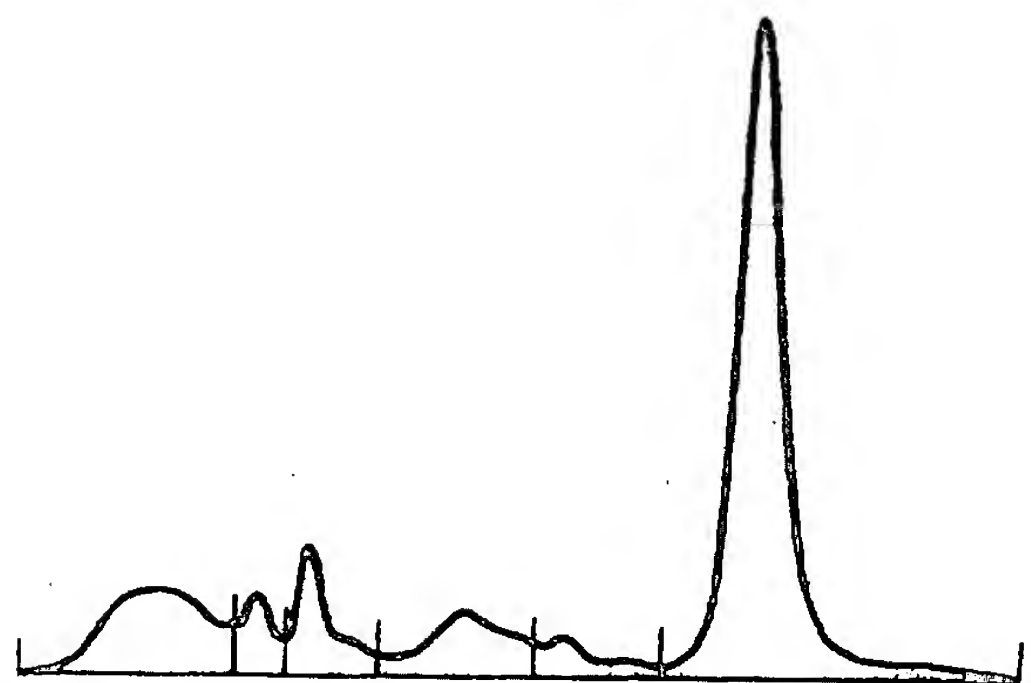
FIG\_2



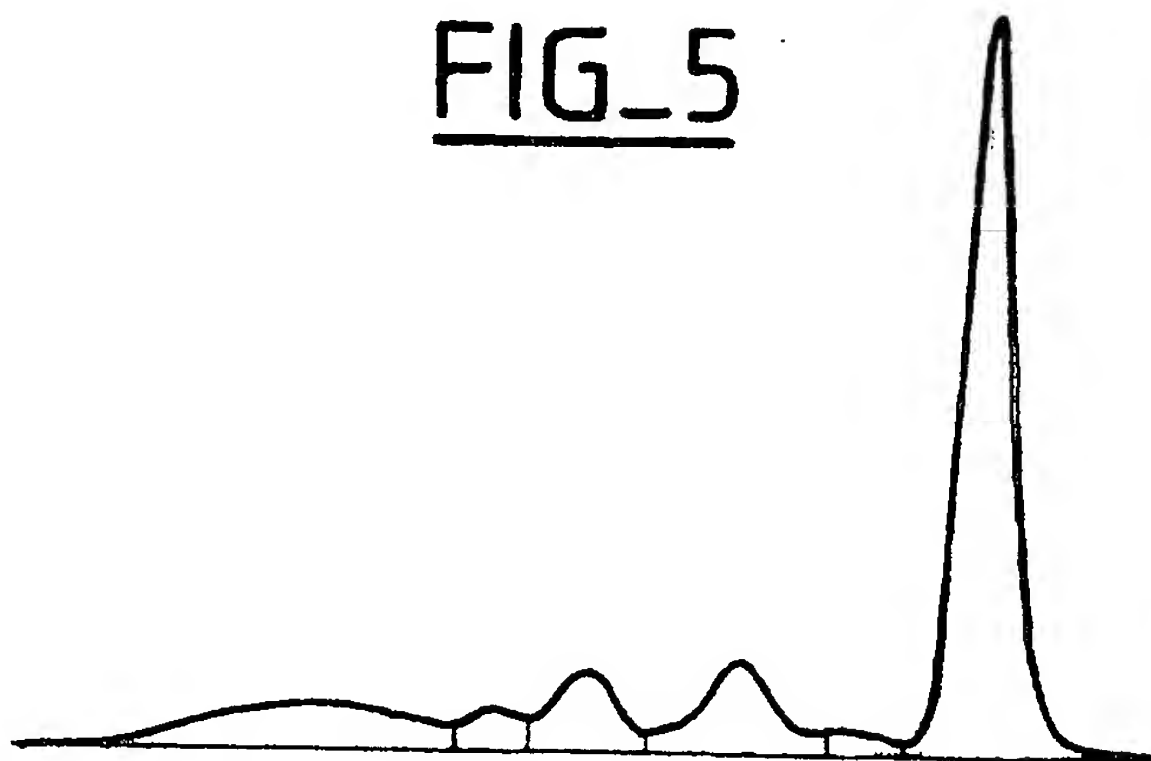
FIG\_3



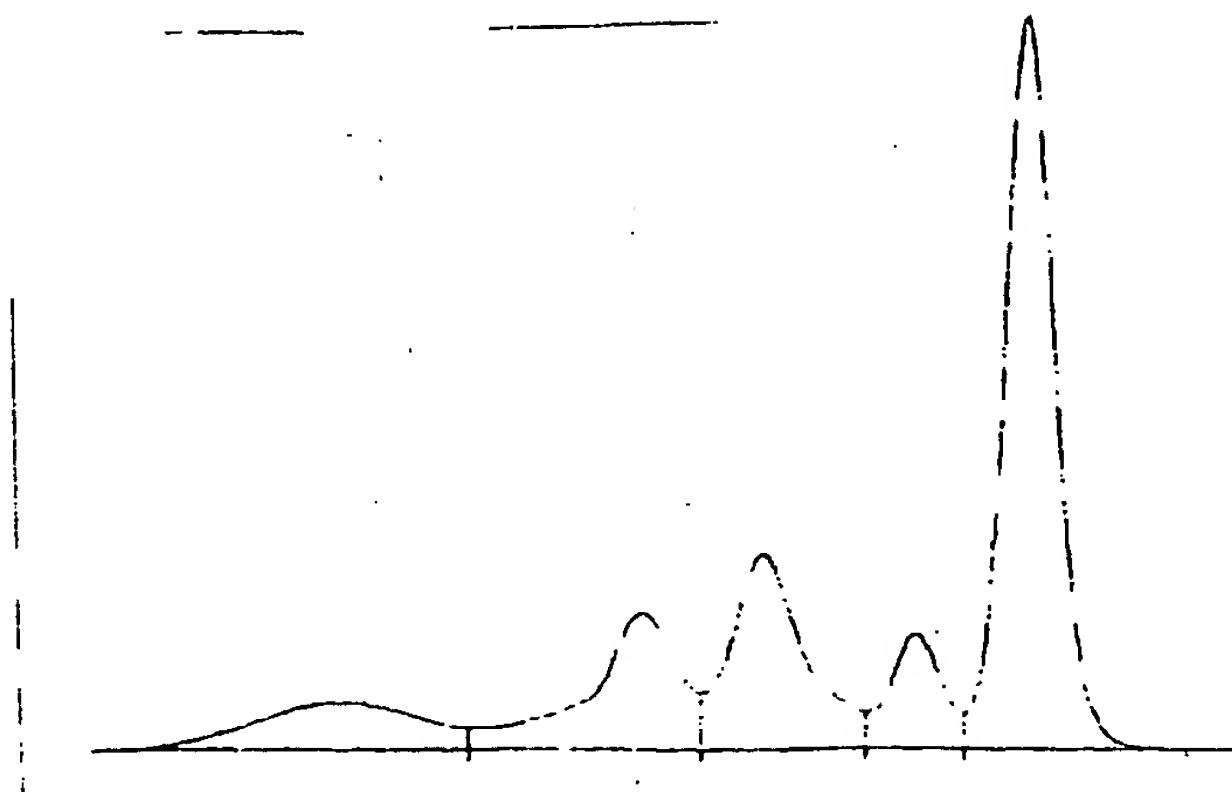
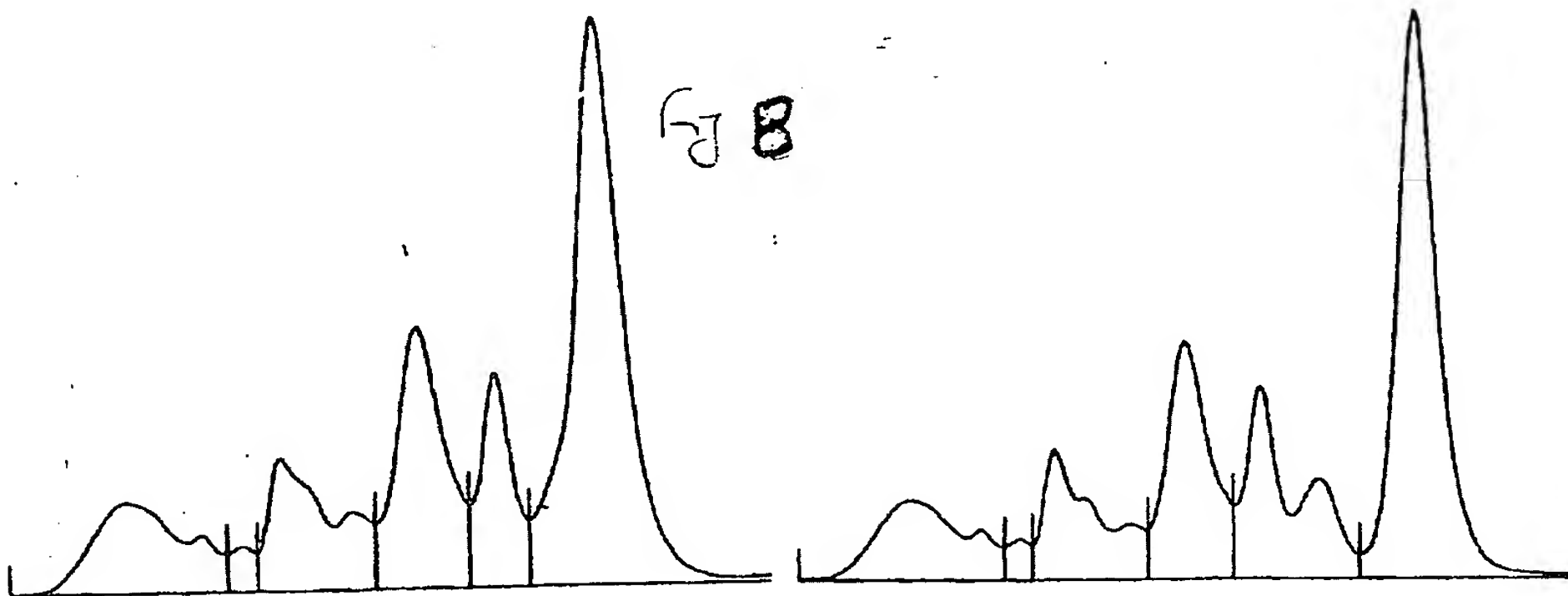
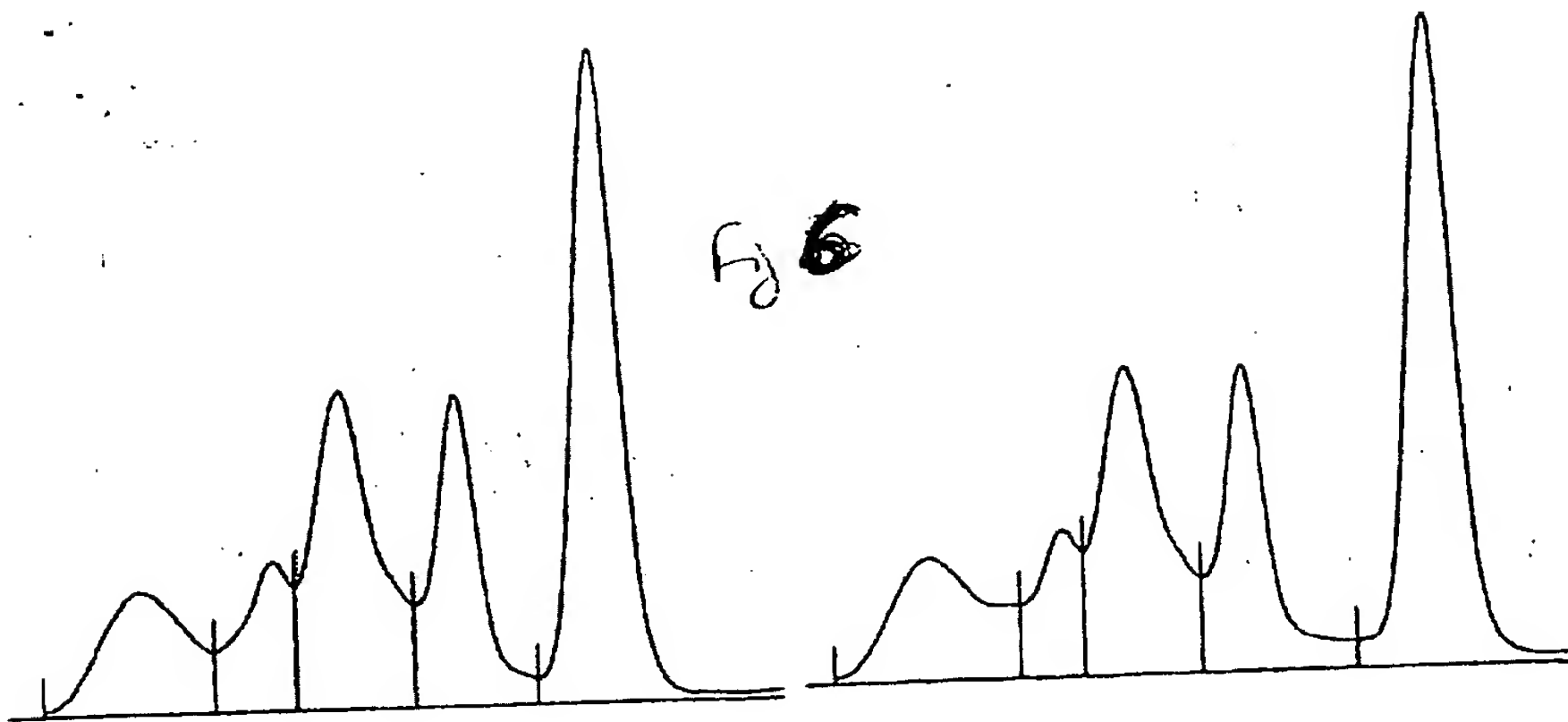
FIG\_4



FIG\_5

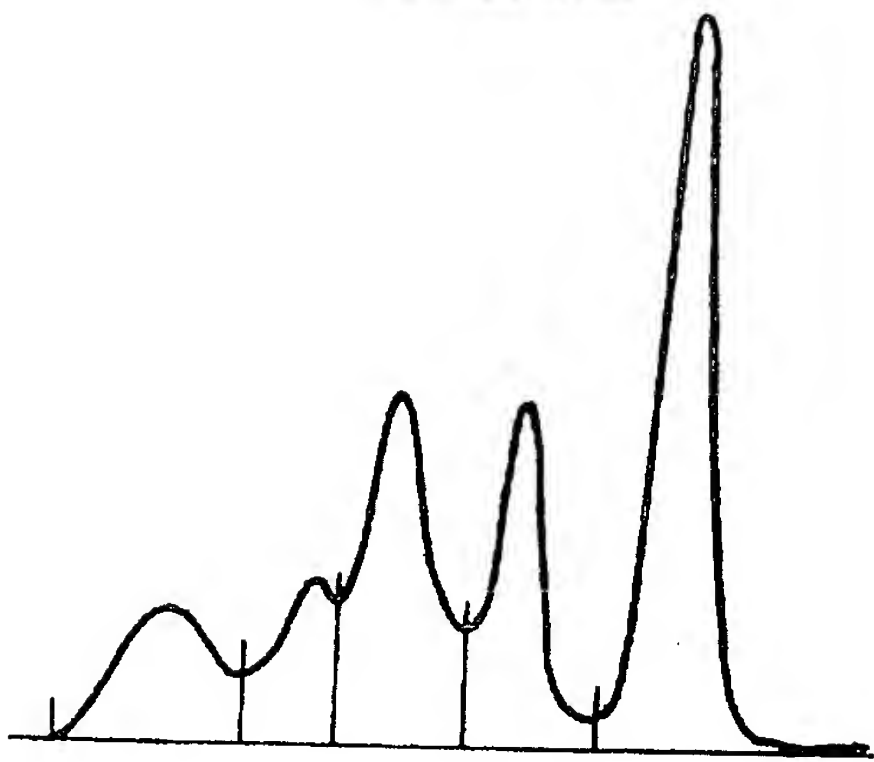


2/3

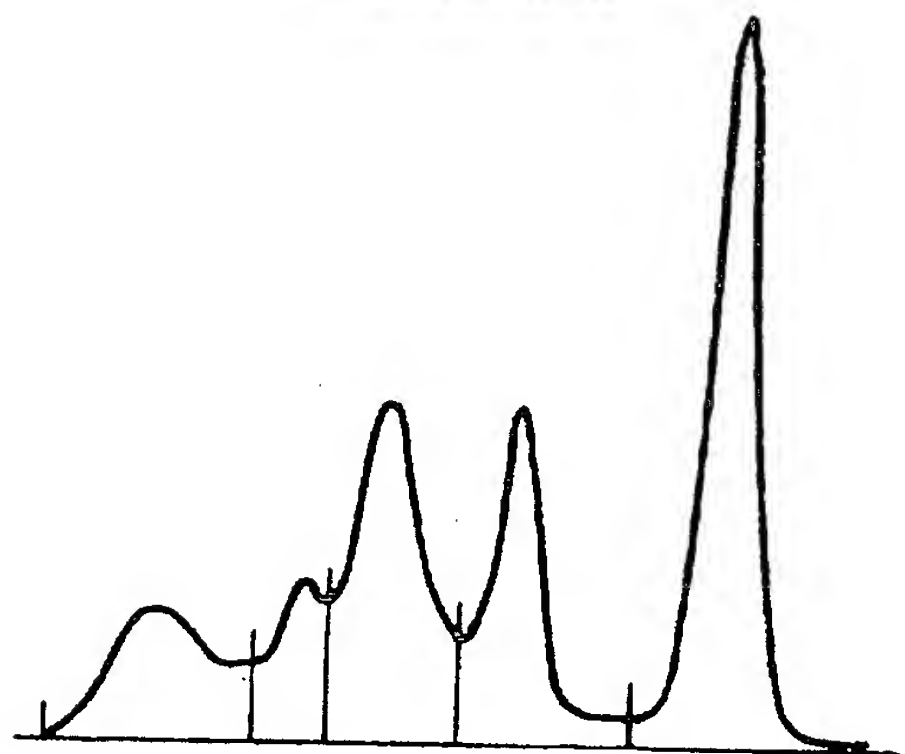


2/3

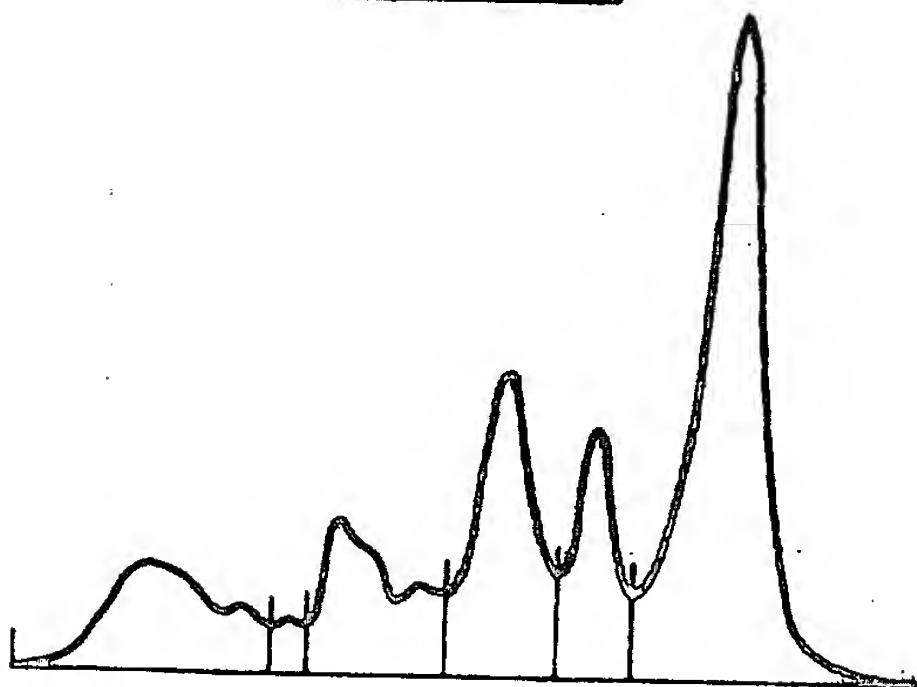
FIG\_6



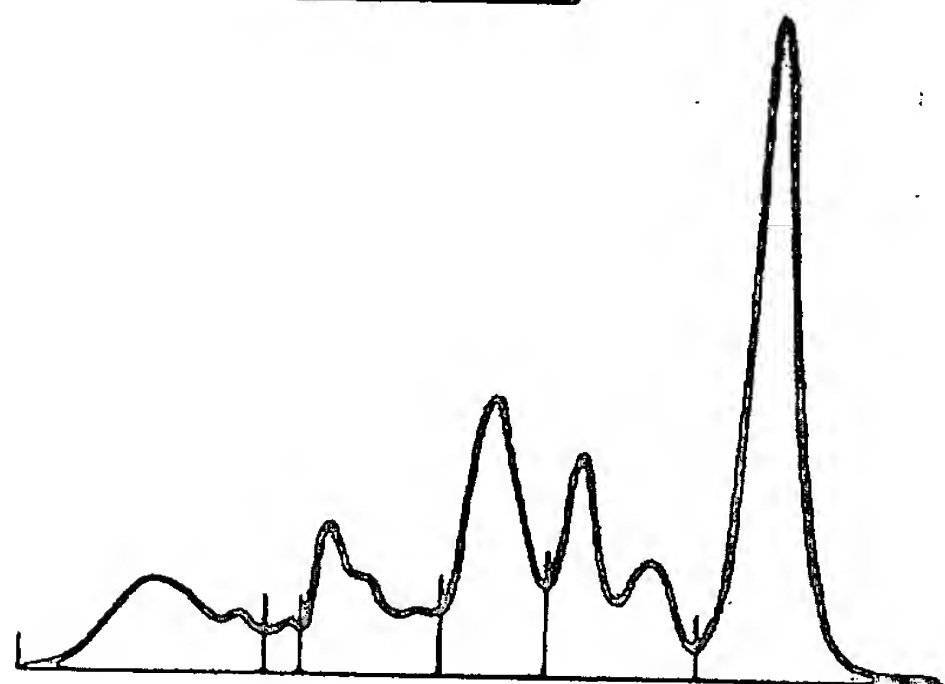
FIG\_7



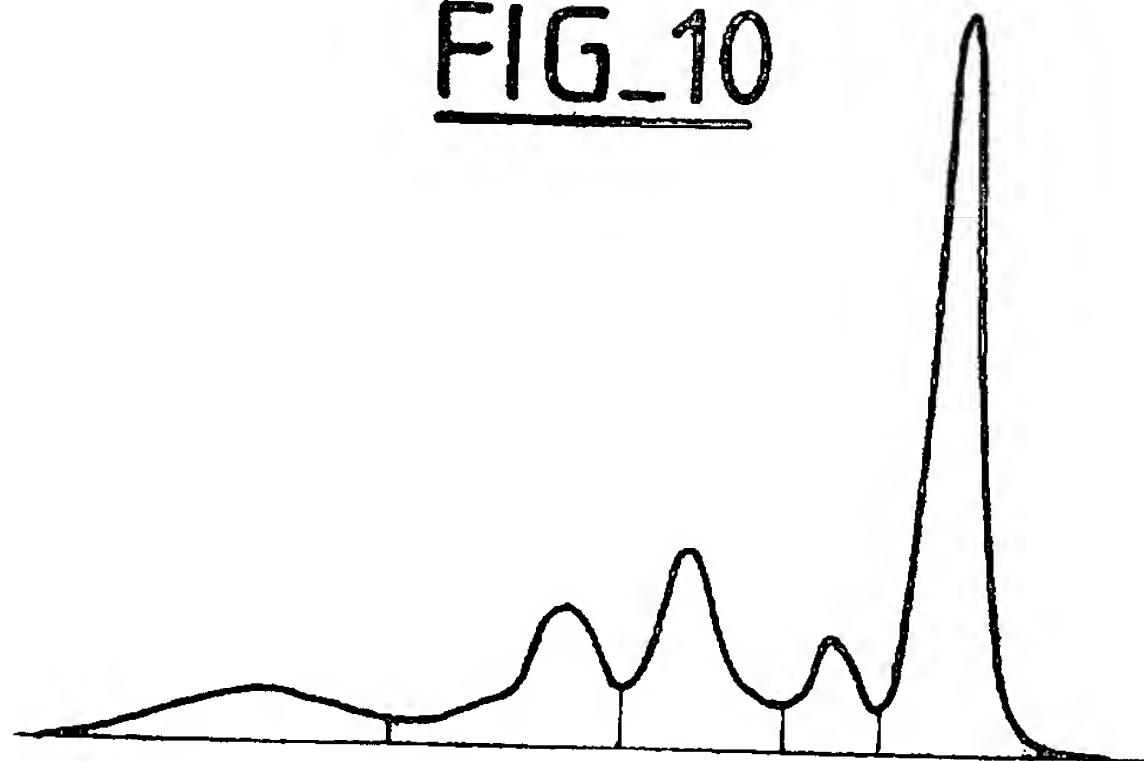
FIG\_8



FIG\_9

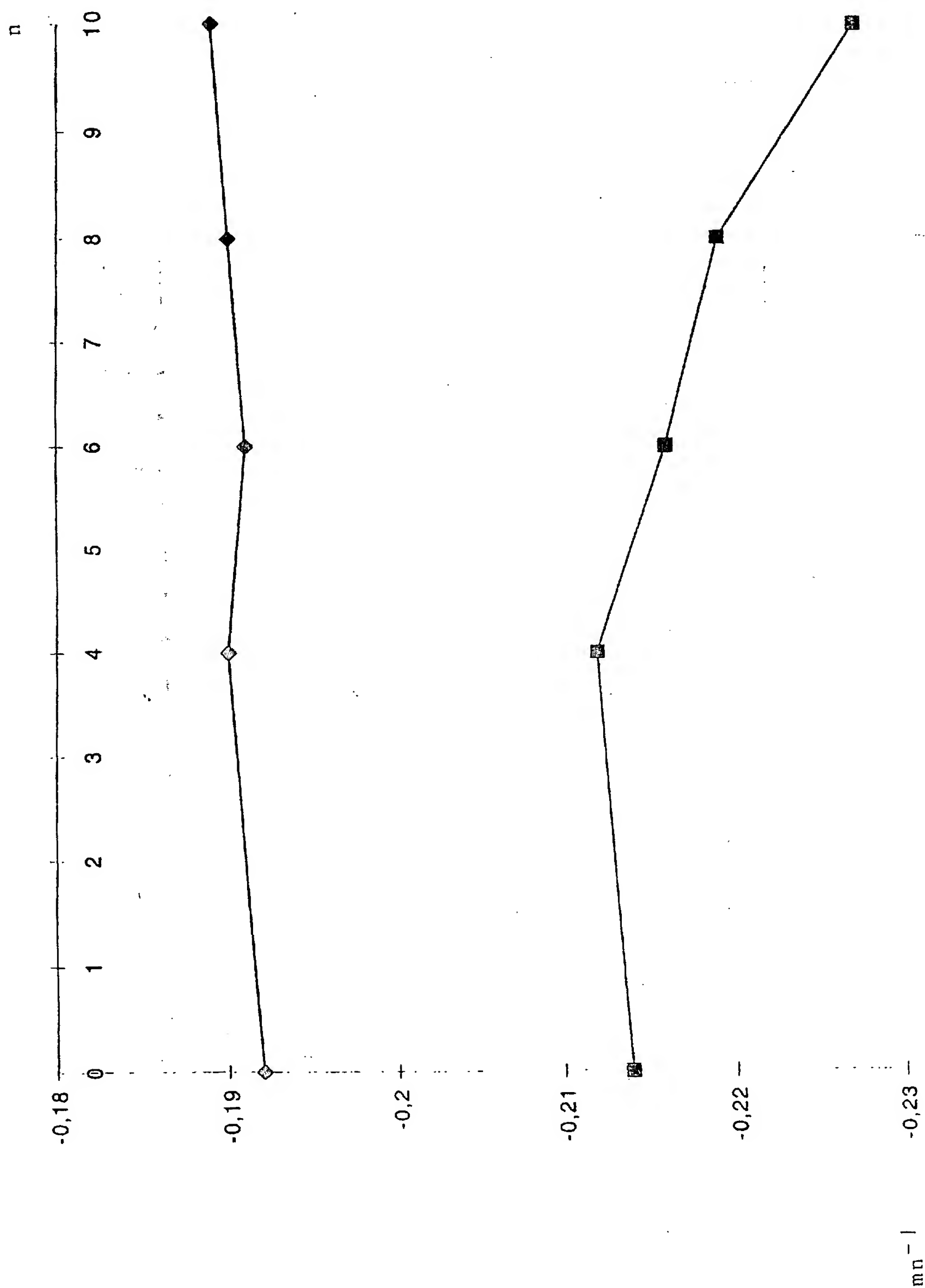


FIG\_10



3/3

Fig 11



3/3

FIG.11

